

10/522239

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
5 février 2004 (05.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/011596 A3(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 5/08,
G01N 33/50(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002376

(22) Date de dépôt international : 28 juillet 2003 (28.07.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/09525 26 juillet 2002 (26.07.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT GUSTAVE-ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille
Desmoulins, F-94800 Villejuif (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : BENARD,
Jean [FR/FR]; 29, rue de la Bergère, F-94240 L'Hay les
Roses (FR).(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, 75847 Paris Cedex 17
(FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 8 avril 2004En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING AN EXTRACELLULAR MATRIX AND ITS USE FOR TUMOR CELL CULTURE

(54) Titre : PROCÉDE DE PREPARATION D'UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE ET SON UTILISATION POUR LA
CULTURE DE CELLULES TUMORALES(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing an isolated extracellular matrix, secreted by tumor cells, in particular
epitheliomatous cells, methods for tumor cell culture using such a matrix, the use of such a matrix for producing a tumor cell line
as well as novel tumor cell lines obtained by said method. The invention also concerns a method for selecting a compound capable
of inhibiting the growth and/or proliferation of tumor cells, the use of said compounds as medicine for cancer treatment as well as a
diagnosis or prognosis method *in vitro* by chromosomal analysis using said matrices. The invention further concerns a reactor or a
kit for cell culture comprising such an extracellular matrix.(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une matrice extracellulaire (MEC) isolée, sécrétée par
des cellules tumorales, notamment des cellules épithéliomateuses, des procédés de culture de cellules tumorales mettant en oeuvre
une telle matrice, l'utilisation d'une telle matrice pour l'établissement de lignée cellulaire tumorale ainsi que de nouvelles lignées
cellulaires tumorales obtenues par ce procédé. L'invention concerne également une méthode de sélection de composé capable d'inhi-
ber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, l'utilisation de tels composés comme médicament pour le traitement du
cancer ainsi qu'une méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique mettant en oeuvre de telles matrices.
La présente invention a aussi pour objet un réacteur ou un kit pour la culture cellulaire comprenant de telle MEC.

WO 2004/011596 A3

DT01 Rec'd PCT/PTC 25 JAN 2005

PROCEDE DE PREPARATION D'UNE MATRICE EXTRACELLULAIRE ET SON
UTILISATION POUR LA CULTURE DE CELLULES TUMORALES

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une matrice
5 extracellulaire (MEC) isolée, sécrétée par des cellules tumorales, notamment des
cellules épithéliomateuses, des procédés de culture de cellules tumorales mettant en
œuvre une telle matrice, l'utilisation d'une telle matrice pour l'établissement de lignée
cellulaire tumorale ainsi que de nouvelles lignées cellulaires tumorales obtenues par
ce procédé. L'invention concerne également une méthode de sélection de composés
10 capables d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, l'utilisation
de tels composés comme médicament pour le traitement du cancer ainsi qu'une
méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique mettant en
œuvre de telles matrices. La présente invention a aussi pour objet un réacteur ou un
kit pour la culture cellulaire comprenant de telle MEC.

15 Les tumeurs solides, épithéliomateuses en particulier, sont difficiles à mettre en
culture et, le cas échéant, à être propagées *in vitro* sous forme de lignées. Une tumeur
solide cancéreuse présente, outre son contingent épithélial malin (cellules
cancéreuses *sensu stricto*), un contingent de cellules stromales (fibroblastes, cellules
endothéliales des vaisseaux tumoraux) sans lequel les cellules malignes ne peuvent
20 se développer *in vivo*.

Qu'il s'agisse des épithélia ou des cellules de soutien, tous les tissus
s'organisent et se polarisent à partir d'une lame basale constituée de matrice
extracellulaire (MEC), ensemble d'intégrines, de protéoglycane, de protéines laminines
et de récepteurs de facteurs de croissance. La composition et la structure de cette
25 MEC sont spécifiques d'un tissu donné.

Sous la lame basale, et dans le cas d'un épithélium, le tissu conjonctif de
soutien est formé de fibroblastes, de macrophages, de mastocytes, et de cellules
endothéliales des vaisseaux nourrissant ce tissu de soutien. Un tel tissu conjonctif
synthétise une MEC très abondante lui permettant de répondre aux tensions,
30 essentiellement mécaniques.

Quant à la MEC des épithélia, elle a un triple rôle :

- maintien des gènes dans leur contexte tissulaire,
- induction de la morphogénèse après adhésion cellulaire,
- prévention de l'apoptose et de l'invasion tumorale (pour corollaire, invasion si

35 phénomène de dégradation).

La composition précise de la MEC des cellules épithéliales et des cellules conjonctives n'est pas connue à l'heure actuelle.

Parmi les réactifs utilisés pour améliorer l'adhésion sur un support de cellules cancéreuses, on peut citer par exemple certaines protéines constitutives de matrice extracellulaire sécrétée par la lame basale d'un épithélium, telles que la laminine, le collagène IV, ou encore la gélatine, commercialisés par de nombreux laboratoires commerciaux. Ces réactifs sont applicables en monocouche sur le plastique des flacons de culture.

On peut également citer les complexes multiprotéiques tels que Matrigel® (« membrane basale-like ») proposés par le Société Sigma (USA). Ces complexes sont de composition inconnue sont extraits généralement à partir de tumeurs expérimentales après une étape de lyse cellulaire.

On peut encore citer les matrices extracellulaires issues de cellules de cordon ombilical et commercialisées par certains Laboratoires Académiques Universitaires.

On peut en outre citer le sérum de veau foetal, contenant des facteurs de croissance et d'adhérence, utilisé dans le milieu de culture de cellules qui favorise l'adhésion des cellules carcinomateuses.

En général, si ces réactifs favorisent l'adhésion des cellules cancéreuses, ceux-ci ne permettent pas de stimuler leur prolifération ou de stimuler leur prolifération de manière constante, ceci du notamment aux variations des lots de fabrication et ainsi de leur qualité.

On peut enfin citer la technique de fabrication d'une matrice extracellulaire proposée par Gospodarowicz et al. (Endocrine Reviews, 1 (3):201-227, 1980), à partir de cellules endothéliales de cornée de bœuf utilisé pour la culture de cellules tumorales, cette matrice présentant une faible stabilité.

Ainsi, il reste de pouvoir disposer d'un réactif biologique constant pour la culture de cellules malignes tumorales permettant d'obtenir à la fois leur adhésion, notamment sur un support plastique, et leur prolifération.

En effet, de tels réactifs pourront être avantageusement utilisés non seulement pour la culture de cellules tumorales mais également pour l'établissement de lignées cellulaires tumorales issues de tumeur primaire. De telles cultures ou lignées pourront être un outil de choix pour étudier leurs propriétés biologiques (acide nucléique, protéine, activités enzymatiques), ou encore pour réaliser des tests prédictifs de sensibilité aux traitements de tumeurs (chimiothérapie et radiothérapie).

Il serait également souhaitable de pouvoir disposer de tels réactifs pour un type de cancer donné permettant la prolifération de cellules tumorales issues d'un prélèvement d'une tumeur chez un patient. En effet la prolifération de telles cellules tumorales ou l'établissement d'une lignée cellulaire à partir de telles cellules permettrait l'étude *in vitro* à court terme des cellules malignes de ce patient et la sensibilité de ces cellules malignes au traitement envisagé avant son administration au patient.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Les inventeurs ont mis en évidence de manière surprenante que des matrices extracellulaires isolées, sécrétées par des cellules tumorales de mammifère, notamment épithéliomateuses, permettaient de faire adhérer et proliférer des cellules tumorales, et permettaient l'établissement de lignée cellulaire tumorale établie à partir de cellules tumorales issues d'un échantillon d'une tumeur primaire et/ou métastatique, ceci en particulier lorsque ces cellules tumorales que l'on cherche à cultiver ou dont on cherche à établir une lignée cellulaire étaient issues d'un tissu de même origine embryonnaire que les cellules tumorales sécrétant ladite matrice.

Ainsi sous un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée, sécrétée par des cellules tumorales d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la mise en culture desdites cellules tumorales d'origine animale sur un support dans des conditions permettant auxdites cellules tumorales d'origine animale de proliférer et de sécréter ladite MEC ; et

b) la récupération de la MEC ainsi formée débarrassée desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention est caractérisé en ce qu'il comprend en outre entre ladite étape a) et ladite étape b) l'étape suivante :

- la lyse desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, le procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales d'origine animale sont des cellules épithéliomateuses.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention est caractérisé en ce

que lesdites cellules tumorales sont des cellules d'une lignée cellulaire tumorale préalablement établie à partir d'une tumeur primaire et/ou d'une prolifération métastatique.

De manière également préférée, l'invention concerne un procédé de
5 préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention, caractérisé en ce que ladite lignée cellulaire tumorale a été établie à partir de cellules tumorales et/ou métastatique issues d'une tumeur mammaire ou ovarienne.

De manière encore plus préférée, l'invention concerne un procédé de
10 préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues d'une tumeur d'origine humaine.

Sous un aspect particulièrement préféré, l'invention a pour objet un procédé de
préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention, caractérisé
15 en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée dans les conditions du traité de Budapest à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, (France) sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

La lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 est une lignée de cellules épithélioïdes
dérivées d'une tumeur primitive d'un cancer ovarien humain. Ces cellules cancéreuses
20 se développent en monocouche et en « grappes » flottantes dans le milieu. Ces « grappes » cellulaires sont capables d'adhérer au plastique. Réciproquement, les cellules adhérentes peuvent proliférer en « grappes » flottantes et c'est le contingent adhérent qui est propagé (Bénard, J. et al., Cancer Research, 45, 4970-4979, 1985).

Sous un deuxième aspect, l'invention a pour objet une matrice extracellulaire
25 (MEC) isolée susceptible d'être obtenue par un procédé de préparation d'une matrice extracellulaire isolée selon la présente invention.

Parmi les MEC isolées selon la présente invention, on préfère tout
particulièrement la MEC isolée sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle
que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

30 De préférence, la MEC isolée selon la présente invention est conditionnée sous une forme fluide, congelée, séchée ou lyophilisée et, le cas échéant, stérilisée.

Sous un troisième aspect, l'invention a pour objet un réacteur pour culture
cellulaire contenant une MEC isolée selon la présente invention.

Sous un quatrième aspect, l'invention a pour objet un procédé de culture de
35 cellules tumorales selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend une

étape dans laquelle lesdites cellules tumorales sont mises en contact avec une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales que l'on désire cultiver étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

5 Sous un cinquième aspect, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie à partir de cellules tumorales issues d'un échantillon d'une tumeur primaire et/ou métastatique d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce que ledit procédé met en œuvre une étape dans laquelle les cellules tumorales contenues dans ledit échantillon de la tumeur et dont on cherche à obtenir une lignée établie sont mises en contact avec une MEC isolée selon la
10 présente invention, lesdites cellules tumorales dont on cherche à obtenir une lignée établie étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

15 Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que le premier tissu tumoral dont sont issues les cellules tumorales à partir desquelles ladite MEC a été obtenue et le deuxième tissu tumoral contenant les cellules tumorales que l'on cherche à cultiver ou dont on cherche à établir une lignée cellulaire sont de même espèce animale, y compris l'Homme.

20 Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont issus indépendamment l'un de l'autre du groupe de tumeurs malignes ou bénignes, notamment issus de tumeurs de l'ovaire, du sein, de la prostate ou de la thyroïde.

25 De préférence encore, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral est un tissu issu d'une tumeur de sein, notamment de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 et ledit deuxième tissu tumoral est issu de tumeurs malignes ou bénignes de l'ovaire, du sein,
30 de la prostate ou de la thyroïde.

35 Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont de même origine embryonnaire.

Par « même origine embryonnaire » pour un tissu tumoral, on entend désigner dans la présente description des tissus tumoraux dérivant des mêmes tissus primitifs embryonnaires (endoderme, ectoderme ou mésoderme). Par exemple, des tumeurs épithéliomateuses ovarienne et mammaires seront considérées comme dérivant d'une même origine embryonnaire puisque les tissus épithéliaux ovariens et mammaires dérivent de l'endoderme.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine embryonnaire différente, de préférence dérivé de l'endoderme et de l'ectoderme, ou inversement.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont indépendamment l'un de l'autre de type mammaire ou ovarien.

Dans un mode de réalisation plus préféré, le procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou le procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral est de type ovarien et ledit deuxième tissu tumoral est de type mammaire ou ovarien.

Sous un aspect particulièrement préféré, l'invention a pour objet un procédé de culture de cellules tumorales selon la présente invention ou un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine humaine.

Sous un sixième aspect, l'invention a pour objet l'utilisation d'une MEC isolée selon la présente invention, comme élément d'un milieu de culture pour la culture cellulaire de cellules tumorales ou pour l'établissement d'une lignée cellulaire de cellules tumorales issues d'une tumeur primaire et/ou d'une prolifération métastatique, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

Sous un septième aspect, l'invention a pour objet une lignée cellulaire tumorale établie obtenue par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention.

Parmi les lignées cellulaires tumorales établies pouvant être obtenues par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale selon la présente invention, on préfère tout particulièrement la lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-OV-22-AS telle que déposée dans les conditions du traité de Budapest à la CNCM sous le
5 numéro I-2894 le 20 juin 2002 ou la lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-BR-11-NS telle que déposée dans les conditions du traité de Budapest à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002.

La lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-OV-22-AS a été établie à partir de cellules épithéliomateuses contenues dans un prélèvement d'ascite péritonéale
10 carcinomateuse d'un adénocarcinome épithélial ovarien humain et sur un contexte génétique de prédisposition au syndrome de cancer du sein et/ou ovaire, le cancer épithélial ovarien s'étant développé chez une patiente constitutionnellement hétérozygote pour le gène BRCA2 (mutation d'un allèle du gène). Ces cellules cancéreuses épithéliomateuses se développent en monocouche.

15 Cancer humain de sein, cellules épithéliomateuses issues d'un nodule.

La lignée cellulaire tumorale dénommée IGR-BR-11-NS a été nouvellement établie sur contexte génétique de prédisposition au syndrome cancer sein/ovaire, chez une patiente hétérozygote BRCA1 (mutée pour un allèle du gène).

Ces cellules cancéreuses épithéliomateuses se développent également en
20 monocouche.

Sous un huitième aspect, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la culture desdites cellules tumorales comprenant au moins une étape de
25 culture sur une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée ;

b) la mise en contact dudit composé avec les cellules tumorales obtenues à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

30 c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation préféré, la méthode de sélection d'un composé selon la présente invention est caractérisée en ce que ladite MEC isolée à l'étape a) est la MEC sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la
35 CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

Dans un mode de réalisation plus préféré, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, notamment de cellules tumorales d'une tumeur ovarienne, de préférence humaine, ou de cellules tumorales de même origine embryonnaire qu'une cellule ovarienne, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé avec une culture de cellules issue de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV-22-AS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2894 le 20 juin 2002 ; et

b) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation également plus préféré, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, notamment de cellules tumorales d'une tumeur mammaire, de préférence humaine, ou de cellules tumorales de même origine embryonnaire qu'une cellule mammaire, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé avec une culture de cellules issue de la lignée cellulaire tumorale d'origine humaine IGR-BR-11-NS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002 ; et

b) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

Dans un mode de réalisation également plus préféré, l'invention a pour objet une méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales d'un patient atteint d'une tumeur à partir d'un échantillon de cellules tumorales prélevées préalablement chez ledit patient, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales prélevées chez le patient par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie par un procédé selon la présente invention ;

b) la mise en contact dudit composé avec un échantillon de la lignée cellulaire tumorale obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération des cellules de la lignée cellulaire tumorale.

Sous un neuvième aspect, l'invention a pour objet l'utilisation d'un composé pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'un cancer caractérisée en ce que ledit composé est sélectionné par un procédé de sélection selon la présente invention.

5 De manière préférée, l'invention concerne l'utilisation d'un composé selon la présente invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer du sein ou des ovaires.

Sous un dixième aspect, l'invention a pour objet une méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique, notamment par cytogénétique et
10 FISH interphasique, de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape dans laquelle lesdites cellules tumorales préalablement prélevées que l'on désire tester sont mises en culture sur une MEC isolée selon la présente invention, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

15 Dans un mode de réalisation préféré, la méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient est caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie par un
20 procédé selon la présente invention ; et

b) l'analyse chromosomique d'un échantillon de cellules de ladite lignée obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la mise en évidence d'une altération génétique d'un ou plusieurs
25 chromosomes par une technique permettant de détecter de telles altérations, notamment par l'analyse karyotypique ou par la technique dite de FISH interphasique.

Le génome des cellules tumorales se caractérise par un ensemble d'altérations génétiques : gain et/ou perte de régions chromosomiques. Le cytogénéticien révèle, en routine, ces altérations à l'aide notamment de deux techniques : l'analyse
30 karyotypique et l'analyse par FISH (« Fluorescent In Situ Hybridization »), techniques bien connues de l'homme de l'art dont nous rappelons ici que certaines étapes afin de noter l'importance de pouvoir disposer de cellules tumorales possédant une capacité proliférative.

- Analyse karyotypique après culture *in vitro* des cellules tumorales

Vingt-quatre heures après ensemencement des cellules tumorales, une solution de colchicine est ajoutée au milieu de culture. Les cellules qui ont adhéré au plastique et qui ont engagé une prolifération, vont se trouver bloquées en mitose révélant ainsi leurs chromosomes. Le rendement des mitoses dans ces conditions est très variable selon le type de tumeur et la capacité proliférative du tissu tumoral.

- Analyse par FISH interphasique sur appositions cellulaires

L'apposition d'un fragment tumoral sur une lame d'observation cytologique permet le dépôt de cellules malignes et, après fixation, une analyse par hybridation fluorescente in situ. Cette analyse ne nécessite pas de cellules en mitose mais s'applique à toutes les cellules, la majorité étant en interphase, une petite minorité étant en mitose permet de visualiser les chromosomes.

Les cellules tumorales épithéliomateuses en présence de matrice extracellulaire selon l'invention, notamment issue de la lignée IGR-OV1 vont adhérer, se différencier et proliférer. Ainsi, selon la technique mise en œuvre par le cytogénéticien pour mettre en évidence les altérations génétiques de cellules tumorales, la matrice extracellulaire de l'invention apporte les améliorations suivantes.

- Pour l'analyse karyotypique

L'analyse karyotypique nécessitant une culture cellulaire préalable pour recruter des cellules en mitoses. Ces cultures sont réalisées habituellement sur un support plastique, ce qui ne favorise pas en particulier l'adhésion et la prolifération des cellules cancéreuses épithéliomateuses. Le rendement de l'analyse est très faible, du fait d'un nombre limité de mitoses. La culture en présence de matrice extracellulaire selon l'invention favorisant l'adhésion spécifique aux cellules tumorales et leur prolifération, le nombre de mitoses de cellules tumorales recrutées par la matrice sera beaucoup plus importante.

- Pour l'analyse FISH

Sur une lame présentant la matrice extracellulaire préalablement préparée, la présence de la matrice extracellulaire selon l'invention apposée sur la lame permet une adhésion accrue des cellules cancéreuses. Les empreintes tumorales réalisées sur la matrice seront plus riche en cellules et réduiront le temps d'analyse.

Sous un dernier aspect, l'invention a pour objet un kit pour la culture de cellules tumorales, notamment issues de tumeur mammaire ou ovarienne, ou pour l'établissement de lignée cellulaire issue desdites cellules tumorales, comprenant une MEC selon l'invention.

La présente invention concerne en outre un support solide, notamment une lame de verre, sur laquelle est apposée une matrice extracellulaire selon la présente invention et son utilisation pour l'analyse chromosomique de cellules tumorales.

Les exemples suivants ont été choisis pour fournir à l'homme de l'art une description complète afin de pouvoir réaliser et utiliser la présente invention. Ces exemples ne sont pas destinés à limiter la portée de ce que les inventeurs considèrent comme leur invention, ni destinées à montrer que seules les expériences ci-après ont été effectuées.

10 Exemples

Exemple 1 : Préparation d'une matrice extracellulaire obtenue à partir de la lignée IGR- OV1

1) Mise en culture des cellules IGR-OV1

Les cellules IGR-OV1 (temps de doublement 25h environ) sont cultivées entre les passages 170 et 210 correspondant à environ 500 générations, nombre de générations garantissant la stabilité de la lignée. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont passées au 1/3 dans des flacons de culture de 25 cm², cultivées dans 5 ml de RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum foetal de veau. Après 3 jours de culture en incubateur, à 37°C en présence de 5 % de CO₂, la confluence des cellules épithéliomateuses est atteinte.

2) Préparation de la matrice

Le milieu de culture surmontant les cellules confluentes est éliminé et remplacé par du tampon PBS (tampon phosphate salin) dépourvue de calcium et de magnésium et préincubé à 37°C. Cette opération est renouvelée 3 fois, elle permet d'éliminer les protéines du milieu de culture dont la présence altérerait la reproductibilité de la lyse cellulaire. Les volumes des 3 tampons successifs sont les suivants :

- 1 ml par puits d'une plaque de 24 puits,
- 2 ml par puits d'une plaque de 6 puits,
- 5 ml pour un flacon de culture de 25 cm²,
- 10 ml pour un flacon de culture de 75 cm².

Après la troisième décantation du PBS, le même volume de NH₄OH 0,02 M préchauffé à 37°C est versé sur les parois du flacon avant d'être appliqué aux cellules confluentes. L'incubation est faite dans l'incubateur à CO₂ à 37°C pendant 6 minutes.

Si à l'issue de ce temps d'incubation la lyse n'est pas totale, elle est poursuivie par tranches de 30 secondes. Lorsque tous les corps cellulaires ont disparu, l'arrêt se fait alors par décantation de la solution ammoniaquée qui est très visqueuse (ADN génomique libéré par les cellules). Le lavage de la matrice se fait par le cycle addition-décantation à 3 reprises du même volume de PBS que le volume de lyse. Le premier lavage peut encore être visqueux. Les lavages doivent être efficaces mais suffisamment doux pour ne pas endommager la matrice.

3) Conservation de la matrice

Les flacons et les plaques de culture contenant la matrice sont conservés sous sacs thermo-soudés dans le $\frac{1}{4}$ du volume du culture d'un milieu PBS contenant des antibiotiques, l'ensemble à 4°C. La matrice ainsi préparée peut être utilisée entre le 3^{ème} et le 21^{ème} jour suivant sa préparation sans dégradation.

4) Matériel et milieux nécessaires

Matériel :

- plaques de culture Costar (boîte de 6, 24 et 96 puits) ;
- flacons de culture Nunc de 25 et 75 cm².

Milieux de culture :

- RPMI 1640 Gibco BRL supplémenté en :

- 2 mM glutamine,
- en antibiotiques : vancomycine (12 µg/ml), gentamycine (10 µg/ml) et fungizone (2 µg/ml).

Le milieu ainsi reconstitué est tamponné par 10 mM final d'HEPES.

- Sérum foetal de veau d'origine canadienne, Sté Biomédia ;
- PBS (PBS pour « Phosphate Buffer Salts ») sans calcium ni magnésium Gibco ;
- Milieu de conservation de la matrice : PBS sans calcium ni magnésium Gibco en présence des antibiotiques et à la concentration finale indiquée ci-dessus.

Exemple 2 : Obtention de deux lignées épithéliomateuses : IGR-0V-22 et IGR-BR-11

A) Etablissement de la lignée épithéliomateuse IGR-0V-22

Le cancer de l'épithélium ovarien se développe sous la forme d'une tumeur solide ovarienne loco-régionale et d'une ascite péritonéale contenant des cellules épithéliomateuses.

La tumeur primitive (TP) et l'ascite (Asc) préalablement prélevés chez une patiente à contexte familial de susceptibilité du cancer du sein et/ou de l'ovaire, patiente constitutionnellement hétérozygote pour le gène BRCA2, ont été réceptionnés par le laboratoire d'anatomo-pathologie.

5 1) Préparation de la tumeur

Il a été pratiqué dans la tumeur des ponctions à l'aide d'une aiguille (22 gauges) et d'une seringue d'1 ml (type insuline) préalablement héparinée. Le contenu de la seringue est repris dans un grand volume de RPMI 1640 – 10 % sérum fœtal de veau, puis centrifugé. Les hématies contaminant le culot cellulaire sont éliminées par un choc hypotonique à l'aide d'eau distillée stérile. La suspension cellulaire est de nouveau centrifugée et enfin reprise dans 4 ml de RPMI 1640 – 10 % sérum fœtal de veau ce qui a permis d'obtenir une suspension de cellules épithéliomateuses à $7,5 \times 10^5$ cellules/ml. La suspension cellulaire ainsi préparée estensemencée dans les 12 puits d'une plaque de culture présentant la matrice extracellulaire sécrétée par la lignée IGR-OV1 préalablement préparée (matrice préparée depuis 17 jours). La densité d'ensemencement est importante, environ 3×10^5 cellules / $4,5 \text{ cm}^2$.

2) Préparation de l'ascite

Un grand volume d'ascite prélevé a été centrifugé en présence de RPMI 1640 – 10 % sérum fœtal de veau. Le culot de population cellulaire obtenu a été ensuite traité dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour la tumeur. Les cellules épithéliomateuses ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits présentant la matrice extracellulaire sécrétée par la lignée IGR-OV1 et en utilisant les mêmes concentrations cellulaires indiquées ci dessus.

3) Culture *in vitro* des cellules épithéliomateuses de la tumeur et de l'ascite

25 L'observation tous les quatre jours des cultures a permis d'objectiver des cellules épithéliomateuses adhérant au substrat, se différenciant (au vu de leur morphologie) et proliférant.

Lorsque la confluence a été observée, les cellules ont été trypsinées à l'aide de trypsine-EDTA 0,025 %, reprises par le milieu RPMI 1640 – 10 % sérum fœtal de veau et réensemencées sur matrice aux mêmes densités d'ensemencement initial.

30 Après amplification des deux populations cellulaires, TP et Asc, dans des boîtes de culture à 12 puits pendant 5 passages, les 5 passages suivants ont été réalisés dans des flacons de culture de plus grande surface de culture, soit 25 cm^2 , présentant à nouveau la matrice extracellulaire.

A l'issue de ces 10 passages sur matrice extracellulaire, les cellules épithéliomateuses sont capables de se propager directement sur plastique. Les cellules tumorales TP et Asc ayant subi 20 passages, les sous-lignées IGR-OV22-Asc et IGR-OV22-TP sont considérées comme établies présentant un phénotype tumoral
5 similaire et typiquement épithéliomateux.

B) Etablissement de la lignée IGR-BR-11

La tumeur primitive (TP) d'un cancer mammaire préalablement prélevée chez une patiente à contexte familial de susceptibilité du cancer du sein et/ou de l'ovaire, patiente constitutionnellement hétérozygote pour le gène BRCA1, a été réceptionnée
10 par le laboratoire d'anatomo-pathologie.

Le protocole indiqué pour l'établissement de la lignée IGR-OV-22 (TP), en particulier les concentrations initiales d'ensemencement, a été strictement identique pour l'établissement de cette lignée IGR-BR-11. A l'issue de 10 passages en présence de matrice extracellulaire, les cellules épithéliomateuses ont été cultivées à raison de
15 30 passages sur plastique en l'absence de matrice extracellulaire. La lignée IGR-BR-11 a été ainsi établie.

Exemple 3 : Culture de cellules épithéliales tumorales de différents types histologiques et de malignité variable à partir de la MEC issue de la lignée cellulaire
20 tumorale IGR-OV1

Des mises en primoculture (P0) initiées sur la MEC issue de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1, suivies de passages successifs (P1, P2, ...) ont été réalisées avec succès avec des cellules issues de :

A) Tumeurs malignes

25 1) Tumeurs cancéreuses du sein (n=8)

Résultats :

- Deux P0 suivies chacune de P1 ; et
- Une lignée établie (P40).

Soit un score de réussite de 3/8 (35 %).

30 2) Tumeurs cancéreuses de l'ovaire (n=5)

Résultats :

- Trois P0 ; et
- Une P0 suivie de P1, P2, P3 et P4.

Soit un score de réussite de 4/5 (80 %).

35 3) Tumeurs cancéreuses de la prostate (n=2)

- Une P0 suivie de P1 et P2.

Soit un score de réussite de 1/2 (50 %).

4) Cancers papillaires de la thyroïde (n=2)

- Deux PO suivies chacune de P1

5 Soit un score de réussite de 2/2 (100 %).

B) Tumeurs à la limite de la malignité et tumeurs bénignes

1) Tumeur « Border-line » de l'ovaire (n=7)

- Trois P0 suivies de P1 ; et

10 - Deux P0.

Soit un score de réussite de 5/7 (70 %).

2) Goitre thyroïdien (n=1)

- Un P0.

Soit un score de réussite de 1/1 (100 %).

15 Ainsi, des primocultures de cellules épithéliales cancéreuses ont été pratiquées avec succès sur MEC non seulement pour les différentes tumeurs malignes suivantes : sein, 3/8 (35 %), ovaires 4/5 (80 %), prostate 1/2 (50 %), thyroïde 2/2 (100 %) ; mais aussi sur des tumeurs ovariennes à la limite de la malignité 5/7 (70 %) et tumeurs bénigne thyroïdienne, 1/1 (100%).

20 Ces résultats indiquent donc l'intérêt des MEC selon la présente invention la matrice IGR-XC pour la culture de tumeurs épithéliales de différents types histologiques et de malignité variables (16/25 soit 65 %) ainsi que pour l'établissement de nouvelles lignées cellulaires.

REVENDEICATIONS

1/ Procédé de préparation d'une matrice extracellulaire (MEC) isolée, sécrétée par des cellules tumorales d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la mise en culture desdites cellules tumorales d'origine animale sur un support dans des conditions permettant auxdites cellules tumorales d'origine animale de proliférer et de sécréter ladite MEC ; et

b) la récupération de la MEC ainsi formée débarrassée desdites cellules tumorales.

2/ Procédé de préparation d'une MEC isolée selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre entre ladite étape a) et ladite étape b) l'étape suivante :

- la lyse desdites cellules tumorales.

3/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales d'origine animale sont des cellules épithéliomateuses.

4/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules d'une lignée cellulaire tumorale préalablement établie à partir d'une tumeur primaire et/ou d'une prolifération métastatique.

5/ Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite lignée cellulaire tumorale a été établie à partir de cellules tumorales et/ou métastatiques issues d'une tumeur mammaire ou ovarienne.

6/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues d'une tumeur d'origine humaine.

7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdites cellules tumorales sont des cellules issues de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

8/ MEC isolée obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 7.

9/ MEC isolée selon la revendication 8, sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

10/ MEC isolée selon la revendication 8 ou 9, conditionnée sous une forme fluide, congelée, séchée ou lyophilisée et, le cas échéant, stérilisée.

11/ Procédé de culture de cellules tumorales, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle lesdites cellules tumorales sont mises en contact avec une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales que l'on désire cultiver étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été
5 sécrétée.

12/ Procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie à partir de cellules tumorales issues d'un échantillon d'une tumeur primaire et/ou métastatique d'origine animale, y compris l'Homme, caractérisé en ce que ledit procédé met en œuvre une étape dans laquelle les cellules tumorales contenues dans ledit échantillon
10 de la tumeur et dont on cherche à obtenir une lignée établie sont mises en contact avec une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales dont on cherche à obtenir une lignée établie étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

13/ Procédé selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisé en ce que
15 le premier tissu tumoral dont sont issues les cellules tumorales à partir desquelles ladite MEC a été obtenue et le deuxième tissu tumoral contenant les cellules tumorales que l'on cherche à cultiver ou dont on cherche à établir une lignée cellulaire sont de même espèce animale, y compris l'Homme.

14/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que
20 ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont de même origine embryonnaire.

15/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine embryonnaire
différente.

16/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que
25 ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont indépendamment l'un de l'autre de type mammaire ou ovarien.

17/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral est de type ovarien et ledit deuxième tissu tumoral est de
30 type mammaire ou ovarien.

18/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 17, caractérisé en ce que ledit premier tissu tumoral et ledit deuxième tissu tumoral sont d'origine humaine.

19/ Utilisation d'une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, comme élément d'un milieu de culture pour la culture cellulaire de cellules tumorales
35 ou pour l'établissement d'une lignée cellulaire de cellules tumorales issues d'une

tumeur primaire, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

20/ Lignée cellulaire tumorale établie obtenue par un procédé selon l'une des revendications 12 à 18.

5 21/ Lignée cellulaire tumorale selon la revendication 20, dénommée IGR-OV-22-AS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2894 le 20 juin 2002.

22/ Lignée cellulaire tumorale selon la revendication 20, dénommée IGR-BR-11-NS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002.

10 23/ Méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la culture desdites cellules tumorales comprenant au moins une étape de culture sur une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée ;

15 b) la mise en contact dudit composé avec les cellules tumorales obtenues à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

20 24/ Méthode de sélection d'un composé selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite MEC isolée à l'étape a) est la MEC sécrétée par la lignée cellulaire tumorale IGR-OV1 telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2893 le 20 juin 2002.

25 25/ Méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé avec une culture de cellules issue de la lignée cellulaire tumorale IGR-OV-22-AS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2894 le 20 juin 2002 ou de la lignée cellulaire tumorale d'origine humaine IGR-BR-11-30 NS telle que déposée à la CNCM sous le numéro I-2895 le 20 juin 2002 ; et

b) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération desdites cellules tumorales.

26/ Méthode de sélection d'un composé capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales d'un patient atteint d'une tumeur à partir

d'un échantillon de cellules tumorales prélevées préalablement chez ledit patient, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales prélevées chez le patient par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie selon l'une des revendications 12 à 18 ;

b) la mise en contact dudit composé avec un échantillon de la lignée cellulaire tumorale obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant normalement leur croissance et/ou leur prolifération ; et

c) la sélection dudit composé si celui-ci est capable d'inhiber la croissance et/ou la prolifération des cellules de la lignée cellulaire tumorale.

27/ Méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse chromosomique, notamment par cytogénétique et FISH interphasique de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape dans laquelle lesdites cellules tumorales préalablement prélevées que l'on désire tester sont mises en culture sur une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10, lesdites cellules tumorales étant différentes de celles à partir desquelles ladite MEC a été sécrétée.

28/ Méthode de diagnostic ou de pronostic *in vitro* par analyse cytogénétique de cellules tumorales préalablement prélevées chez un patient, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'établissement d'une lignée cellulaire tumorale à partir desdites cellules tumorales par un procédé de préparation d'une lignée cellulaire tumorale établie selon l'une des revendications 12 à 18 ; et

b) l'analyse cytogénétique d'un échantillon de cellules de ladite lignée obtenue à l'étape a) dans des conditions permettant leur croissance et/ou leur prolifération.

29/ Kit pour la culture de cellules tumorales, notamment issues de tumeur mammaire ou ovarienne, ou pour l'établissement de lignée cellulaire issue desdites cellules tumorales, comprenant une MEC selon l'une des revendications 8 à 10.

30/ Réacteur pour culture cellulaire contenant une MEC isolée selon l'une des revendications 8 à 10.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/02376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/08 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 383 805 B1 (LATIMER J.J.) 7 May 2002 (2002-05-07) the whole document	1-29
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 20 March 2002 (2002-03-20), NAKAMURA KATSUYA ET AL: "A novel in vitro model system simulating in vivo carcinoma tissue." XP002244009 Database accession no. PREV200200368584 abstract -/-	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2004

Date of mailing of the international search report

02/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP03/02376

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>& FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 4, 20 March 2002 (2002-03-20), page A472, Annual Meeting of the Professional Research Scientists on Experimental Biology; New Orleans, Louisiana, USA; April 20-24, 2002, March 20, 2002 ISSN: 0892-6638</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR03/02376

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6383805	B1	07-05-2002	US 6074874 A	13-06-2000
		CA 2243130 A1	28-02-1999	
		EP 0911389 A2	28-04-1999	
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/02376

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N5/08 G01N33/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 383 805 B1 (LATIMER J.J.) 7 mai 2002 (2002-05-07) le document en entier	1-29
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 20 mars 2002 (2002-03-20), NAKAMURA KATSUYA ET AL: "A novel in vitro model system simulating in vivo carcinoma tissue." XP002244009 Database accession no. PREV200200368584 abrégé -/--	1-29

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 février 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/03/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la demande internationale No

PCT/FR 03/02376

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
	<p>& FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 4, 20 mars 2002 (2002-03-20), page A472, Annual Meeting of the Professional Research Scientists on Experimental Biology; New Orleans, Louisiana, USA; April 20-24, 2002, March 20, 2002 ISSN: 0892-6638</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

membre(s) de la famille de brevets

Demande internationale No

PCT/F/02376

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6383805	B1	07-05-2002	US	6074874 A	13-06-2000
			CA	2243130 A1	28-02-1999
			EP	0911389 A2	28-04-1999
<hr/>					